

**MICHELE LOPES AMORIM**

**INCIDÊNCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* EM VÁRIAS  
FONTES NATURAIS – HORTALIÇAS E TUBÉRCULOS DE HORTAS  
DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA.**

**Monografia apresentada ao Curso de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal  
do Paraná para obtenção do grau de  
Bacharel.**

**Orientadora: Marita M. M. Blaskowski.**

**Co-Orientadora: Ida Chapaval Pimentel.**

**CURITIBA  
2002**

## AGRADECIMENTOS

Às orientadoras, professoras Marita M. M. Blaskowski e Ida Chapaval pela orientação, experiência, paciência e amizade nesses meses de trabalho em conjunto.

À professora Ilma Hiroko Higuti por compartilhar seus meios de cultura e sua experiência para a realização deste trabalho.

Ao professor Mário de Oliveira Branco Filho pelos seus conhecimentos.

Ao professor Armando C. Cervi, do Departamento de Botânica, pela ajuda com a nomenclatura científica dos vegetais.

À técnica de laboratório Clotilde Hadas, pela grande ajuda no preparo dos meios de cultura e do material utilizado, sempre com paciência e atenção.

À Débora C. Gineste pela amizade e incentivo nas horas difíceis.

Aos colegas de laboratório pela amizade e pela ajuda com os materiais.

Ao Sideval Ruppel pelas fotos utilizadas neste trabalho.

Aos meus pais e minha irmã pelo incentivo, carinho e compreensão.

À minha sogra pelo incentivo e compreensão.

Em especial ao meu marido, João Alberto, por todo o incentivo, todo o carinho, toda a ajuda e paciência e por nunca me deixar desistir dos meus ideais.

À Deus por guiar meu caminho e permitir que mais uma etapa de minha vida fosse vencida.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1 Caracterização da espécie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e sua importância para os seres humanos.....	2
2.2 Vegetais como via de transmissão.....	2
2.3 Contaminação dos Vegetais.....	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	5
3.1 Amostras.....	5
3.2 Soluções.....	7
3.2.1. Solução de FeSO <sub>4</sub> .....	7
3.2.2. Solução de glicose a 10%.....	7
3.3 Meios de Cultura.....	7
3.3.1. Meio de Burtom.....	7
3.3.2. Meio de Burtom enriquecido com a Piocianina.....	7
3.3.3. Meio Cetrimide ou Ágar Cetrimide - seletivo para <i>Pseudomonas</i> .....	8
3.3.4. Meio Teague ou Ágar de eosina e azul de metileno – seletivo para bacilos Gram-negativos.....	8
3.3.5. Meio P - para estimular a produção de pigmento .....	9
3.3.6. Meio Hugh-Leifson ou Bacto O-F desidratado.....	9
3.3.7. Meio semi-sólido para testar a Motilidade.....	10
3.3.8. Ágar Gelose.....	10

3.3.9 Caldo Lactosado.....	10
3.3.10 Caldo Simples.....	11
3.4 Coleta.....	11
3.4.1 Extração do pigmento piocianina para enriquecimento do meio Burtom .....	11
3.4.2 Isolamento e Provas Bioquímicas .....	13
3.4.2.1 Hugh-Leifson.....	15
3.4.2.2 Motilidade.....	15
3.4.2.3 Meio “P”.....	16
3.4.2.4 Prova da citocromo - oxidase pelo método de Kovacs .....	16
3.4.2.5. Método da Coloração de Gram.....	16
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>31</b>

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1:** Vegetais, solo e água coletados na horta do Colégio Bom Jesus, e semeados nos meios caldo lactosado (CL), Burtom (BU), teague (TE), cetrímide (CE), Hugh-Leifson (O-F, oxidação-fermentação), "P", e nas provas bioquímicas motilidade e oxidase.....17

**TABELA 2:** Vegetais, solo e água coletados na horta da Rua Francisco Caron, e semeados nos meios Caldo lactosado (CL), Burtom (BU), Teague (TE), Cetrimide (CE), Hugh-Leifson (O-F, oxidação-fermentação), "P", e nas provas bioquímicas Motilidade e Oxidase. ....23

**TABELA 3:** Vegetais, solo e água coletados na horta da Rua Alberto Piekars, e semeados nos meios Caldo lactosado (CL), Burtom (BU), Teague (TE), Cetrimide (CE), Hugh-Leifson (O-F, oxidação-fermentação), "P", e nas provas bioquímicas Motilidade e Oxidase.....24

**TABELA 4:** Vegetais, solo e água coletados na horta da Colônia Avenal, e semeados nos meios Caldo lactosado (CL), Burtom (BU), Teague (TE), Cetrimide (CE), Hugh-Leifson (O-F, oxidação-fermentação), "P", e nas provas bioquímicas Motilidade e Oxidase.....25

**TABELA 5:** Vegetais, solo e água coletados na horta do Colégio Nossa Senhora da Assunção, e semeados nos meios Caldo lactosado (CL), Burtom (BU), Teague (TE), Cetrimide (CE), Hugh-Leifson (O-F, oxidação-fermentação), "P", e nas provas bioquímicas Motilidade e Oxidase.....26

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Coleta de vegetais, solo e água de irrigação da horta do Colégio Bom Jesus.....	6
<b>FIGURA 2:</b> Extração do Pigmento.....	13
<b>FIGURA 3:</b> Meio de Burtom enriquecido (1) e Caldo lactosado (2) ambos inoculados com amostra, semeados em placas contendo os meios Teague (TE) e Cetrimide (CE).....	14
<b>FIGURA 4:</b> Tubos de ensaio contendo o meio Hugh-Leifson.....	18
<b>FIGURA 5:</b> Tiras para oxidase utilizadas para confirmar o metabolismo oxidativo das bactérias.....	19
<b>FIGURA 6:</b> Meio para testar a motilidade.....	20
<b>FIGURA 7:</b> Meio P utilizado para estimular a produção do pigmento produzido pelo gênero <i>Pseudomonas</i> .....	21
<b>FIGURA 8:</b> Placa contendo os meios Teague (metade vermelha) e Cetrimide (metade branca), mostrando a formação de colônias.....	22

## RESUMO

As bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* são bacilos Gram negativos, com a capacidade de produzir pigmento azul esverdeado denominado piocianina. Essa espécie pode ser encontrada em várias fontes naturais como fezes de animais, solo, água, alimentos e outras fontes. Trata-se de uma bactéria causadora de surtos infecciosos em ambientes hospitalares e com resistência intrínseca a muitos agentes antimicrobianos. A ingestão de alimentos, como vegetais contaminados por *Pseudomonas aeruginosa*, é uma das possíveis fontes de contaminação de pacientes hospitalizados.

Neste trabalho, pesquisou-se a incidência de *Pseudomonas aeruginosa* em hortaliças, tubérculos, solo e água de irrigação adquiridos diretamente de hortas da cidade de Curitiba e Região Metropolitana. A partir dos resultados obtidos, foi demonstrada a incidência de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de vegetais de duas das cinco hortas visitadas. As amostras abobrinha e nabo continham a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, mas também foi observada a presença de outras bactérias do gênero *Pseudomonas* nas amostras solo, beterraba, brócolis e couve. O que sugere que os vegetais podem, provavelmente, ser um reservatório natural para essa espécie.

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* está amplamente distribuída na natureza, presente no solo, na água, e em muitos alimentos (na superfície de hortaliças, na carne crua) (BELTRAME, 1999). Essa bactéria tem despertado grande interesse no campo da epidemiologia, por ser causadora de surtos infecciosos em ambientes hospitalares (OLIVEIRA, 1983 ). A importância clínica deve-se à sua resistência intrínseca a muitos agentes antimicrobianos (BELTRAME, 1999). Nos hospitais, as vias de transmissão de *P. aeruginosa* são representadas por respiradores, catéteres, alimentos, água, desinfetantes, etc., sendo a bactéria introduzida no hospital tanto através de indivíduos portadores como através de frutas e vegetais (ALTERTHUN, 1999). A ingestão de alimentos, como vegetais contaminados por *Pseudomonas aeruginosa*, é uma das possíveis fontes de contaminação de pacientes hospitalizados (WRIGHT, 1976).

Por se tratar de um patógeno ubíquo e oportunista faz-se necessário controlar as prováveis fontes de contaminação desse microrganismo. As infecções causadas por *P. aeruginosa* são mais frequentes em pacientes hospitalizados debilitados ou que recebem terapia antibiótica, imunodepressiva e citotóxica. Através da ingestão de saladas e vegetais crus contaminados, esses pacientes podem adquirir infecções graves e, muitas vezes, fatais.

Neste trabalho objetivou-se demonstrar a incidência de *Pseudomonas aeruginosa* em hortaliças, tubérculos, solo e água de irrigação adquiridos diretamente de hortas da cidade de Curitiba e Região Metropolitana.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

### 2.1. Caracterização da espécie *Pseudomonas aeruginosa* e sua importância para os seres humanos.

As bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* são bacilos Gram negativos, retos ou curvos, com flagelo polar, não fermentadores. Uma das características principais da espécie é a capacidade de produzir o pigmento azul esverdeado denominado piocianina, por essa razão ela também é conhecida como bacilo piocianico (ALTERTHUN, 1999).

A ubiquidade da *Pseudomonas aeruginosa* é bastante diversa. As bactérias dessa espécie podem ser isoladas de várias fontes naturais como fezes de animais, solo, água e outras fontes. Algumas espécies do gênero *Pseudomonas* são patogênicas a animais e vegetais. Essas espécies podem estar no corpo do animal de forma não parasitária, ou podem invadir os tecidos e causar infecções no trato intestinal ou em outras partes do corpo (RINGEN, 1952).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é considerada atualmente um dos mais freqüentes agentes causadores de infecções associadas a hospitais (GREEN, 1974). Essa bactéria está freqüentemente envolvida em doenças nosocomiais infectando pacientes debilitados tais como queimados e aqueles que recebem terapia antibiótica, citotóxica ou imunodepressiva, bem como pacientes com catéteres e os que recebem assistência respiratória (KOMINOS, 1972).

### 2.2. Vegetais como via de transmissão.

A transmissão de *Pseudomonas aeruginosa* no ambiente hospitalar pode ocorrer por três vias: contato direto entre pacientes; reservatório ambiental para pacientes; e

colonização do paciente seguido de infecção, sendo a última via a mais freqüente (CORREA, 1990).

Em vários estudos feitos na cozinha dos hospitais, os pesquisadores recuperaram *P. aeruginosa* e outras bactérias das saladas e de vegetais crus antes de serem servidos aos pacientes (WRIGHT, KOMINOS, YEE, 1976; CORREA, TIBANA, GONTIJO FILHO, 1990; REMINGTON e SCHIMPF, 1981; GREEN et al., 1974; KOMINOS et al., 1972).

SHOOTER et al., 1971, examinaram alimentos não cozidos e cozidos na cozinha de um hospital e encontraram *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella* sp. Eles sugeriram que esses organismos se estabelecem no trato intestinal dos pacientes quando ingeridos com tais alimentos (KOMINOS et al., 1972).

O número de microrganismos ingerido pelo paciente para que se estabeleça a colonização intestinal varia de acordo com o regime terapêutico, a doença de base e o comprometimento do intestino. BUCK e COOKE, 1969 relataram que a ingestão de até  $10^6$  microrganismos não está associada com a colonização em adultos sadios. Contudo, quando a resistência dos pacientes está reduzida, seja pelo uso terapêutico ou profilático de agentes antimicrobianos, o inóculo necessário para induzir a colonização reduz-se à faixa de 10 a 100 microrganismos. Segundo LEVINSON, 1977, o uso prolongado de antimicrobianos suprime a flora do intestino grosso e conseqüentemente reduz a produção de ácidos graxos de cadeia curta, elementos inibidores naturais da colonização por *P. aeruginosa*.

A contaminação dos vegetais é usualmente extra-hospitalar e representa a própria flora ou pode resultar do solo onde são cultivados. Todavia não está afastada a possibilidade de aquisição dos microrganismos no ambiente intra-hospitalar através de sua manipulação (CORREA, TIBANA, GONTIJO FILHO, 1990).

### 2.3. Contaminação dos Vegetais.

A espécie *P. aeruginosa* pode ser adquirida do solo, de fertilizantes ou água de irrigação e ela tem a capacidade de colonizar plantas durante condições favoráveis de temperatura e umidade (GREEN et al., 1974; KOMINOS et al., 1972).

As principais fontes de contaminação dos vegetais são o cultivo, a colheita, os estágios de processamento e as diferentes fases de empacotamento, o armazenamento, o transporte, a distribuição, e a manipulação para o seu preparo (SORIANO,2000; ARROYO,1998). O gênero *Pseudomonas* é capaz de utilizar uma grande variedade de substratos, o que a torna excepcionalmente importante em relação à alteração dos alimentos (ARROYO et al., 1998).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras

As amostras utilizadas nesse experimento foram as seguintes:

##### Hortaliças:

- Alface – *Lactuca sativa* L.;
- Almeirão – *Cichorium intybus* L.;
- Brócolis – *Brassica oleracea* L. var. italica.;
- Couve – *Brassica oleracea* L. var. acephala DC.;
- Repolho – *Brassica oleracea* L. var. capitata.;

##### Tubérculos:

- Abobrinha – *Cucurbita pepo* L.;
- Beterraba – *Beta vulgaris* L.;
- Cenoura – *Daucus carota* L.;
- Nabo – *Brassica napus* var. napobrassica.;

##### Solo e água de irrigação.

As amostras foram coletadas de cinco (5) hortas em Curitiba e na Região Metropolitana, descritas a seguir:

Coleta 1: Colégio Bom Jesus – Nossa Senhora de Lurdes – Rua: Fioravante Dala Estela, 90 –Cajuru. Data: 20/11/01.

Coleta 2 : Rua: Francisco Caron, 355 – Pilarzinho. Data: 29/11/01.

Coleta 3 : Rua: Alberto Piekars, 252 – Almirante Tamandaré. Data:18/01/02.

Coleta 4 : Colônia Avenal – São José dos Pinhais. Data: 26/01/02.

Coleta 5 : Colégio Nossa Senhora da Assunção – Rua: Alcides Vieira Arcoverde, 620 – Guabirota. Data: 06/02/02.

FIGURA 1: Coleta de vegetais, solo e água de irrigação da horta do Colégio Bom Jesus.



### 3.2. Soluções

#### 3.2.1. Solução de $\text{FeSO}_4$

Foi utilizado 1g de  $\text{FeSO}_4$  para 100mL de água destilada.

#### 3.2.2. Solução de glicose a 10%.

Foram utilizados 100g de glicose para 1000 mL de água destilada.

### 3.3. Meios de Cultura

#### 3.3.1. Meio de Burtom:

- Água destilada..... 500mL
- Glicerol ..... 10mL
- Glicina..... 3,0g
- L-leucina..... 3,0g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....0,2g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  .....10,0g
- $\text{FeSO}_4$  a 1% .....1mL

Metade da água foi colocada para aquecer, juntamente com a glicina, o  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , o  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e a L-leucina. Em seguida acrescentou-se o glicerol, a solução de  $\text{FeSO}_4$  e o restante da água. O pH foi ajustado para 7,0 – 7,2 com hidróxido de sódio a 4% ou ácido clorídrico a 10%.

#### 3.3.2. Meio de Burtom enriquecido com a Piocianina:

Os ingredientes foram os mesmos citados no item 3.3.1, porém usou-se apenas 80% da água e acrescentou-se 20% do pigmento. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos à 1 atm.

### 3.3.3. Meio Cetrimide ou Ágar Cetrimide - seletivo para *Pseudomonas*

- Água destilada ..... 1000mL
- Peptona de gelatina ..... 20,0g
- Cloreto de magnésio ..... 1,4 g
- Sulfato de potássio ..... 10,0g
- N-Cetil-N,N,N-trimetilamonio brometo..... 0,3g
- Ágar-ágar..... 12,6g
- Glicerina ..... 10mL

Suspendeu-se os ingredientes em 1000 mL de água destilada, adicionou-se 10 mL de glicerina e ferveu-se até a completa dissolução do meio. O pH foi ajustado para  $7,2 \pm 0,2$  com hidróxido de sódio a 4% ou ácido clorídrico a 10%.

### 3.3.4. Meio Teague ou Ágar de eosina e azul de metileno (BIOBRÁS) – seletivo para bacilos Gram-negativos.

- Água destilada..... 1000mL
- Peptona de gelatina..... 10,0g
- Lactose..... 5,0g
- Sacarose..... 5,0g
- Fosfato dipotássico..... 2,0g
- Ágar..... 13,5g
- Eosina..... 0,4g
- Azul de metileno..... 0,065g

Suspendeu-se os ingredientes em 1000 mL de água destilada, aqueceu-se agitando-se freqüentemente, e ferveu-se durante 1 minuto aproximadamente. O pH foi ajustado para  $\pm 7,2$  com hidróxido de sódio a 4% ou ácido clorídrico a 10%.

### 3.3.5. Meio P - para estimular a produção de pigmento.

- Água destilada ..... 1000mL
- Peptona de gelatina ..... 20,0g
- Cloreto de magnésio ..... 1,4 g
- Sulfato de potássio ..... 10,0g
- Ágar-ágar ..... 12,6g
- Glicerina ..... 10mL

Suspendeu-se os ingredientes em 1000 mL de água destilada, adicionou-se 10 mL de glicerina e ferveu-se até a completa dissolução do meio. O pH foi ajustado para  $7,0 \pm 0,2$  com hidróxido de sódio a 4% ou ácido clorídrico a 10%.

### 3.3.6. Meio Hugh-Leifson ou Bacto O-F desidratado

- Água destilada..... 100mL
- Triptona ou triptose..... 0,2g
- Cloreto de sódio..... 0,5g
- Fosfato di bi sódico..... 0,03g
- Azul de bromotimol (sol. a 1%)..... 0,3g
- Ágar-ágar..... 0,25g

Suspendeu-se os ingredientes em 100 mL de água destilada e aqueceu-se até fervura para dissolução completa. Autoclavou-se a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos à 1 atm e após resfriado, adicionou-se, assépticamente, 10 mL de solução de glicose a 10% estéril. O pH foi ajustado para 7,1 com hidróxido de sódio a 4% ou ácido clorídrico a 10%.



### 3.3.7. Meio semi-sólido para testar a Motilidade - (DIFCO)

- Água destilada..... 1000mL
- Bacto triptose..... 10,0g
- Cloreto de sódio..... 5,0g
- Ágar bacteriológico..... 5,0g

Suspendeu-se os ingredientes em 1000 mL de água destilada e ferveu-se até dissolução completa. O pH foi ajustado para  $7,2 \pm 0,2$  com hidróxido de sódio a 4% ou ácido clorídrico a 10%.

### 3.3.8. Ágar Gelose:

- Caldo Simples..... 1000 mL
- Ágar Bacteriológico (gelose)..... 15g

Misturou-se os ingredientes, aquecendo até fervura.

### 3.3.9. Caldo Lactosado:

- Água destilada..... 500 mL.
- Peptona..... 7,5g
- Cloreto de sódio..... 2,5g
- Lactose..... 5,0g

Misturou-se os ingredientes, aquecendo até fervura.

### 3.3.10. Caldo Simples:

- Água destilada..... 1000 mL
- Extrato de carne..... 4,0g
- Peptona..... 10g
- Cloreto de Sódio..... 4,0g

Aqueceu-se a água para dissolver todos os componentes e ferveu-se por 10 minutos. O pH foi ajustado para 7,4 – 7,6 com hidróxido de sódio a 4% ou ácido clorídrico a 10%.

Todos os meios citados acima foram autoclavados à 121°C, 1 atm por 15 minutos.

### 3.4. Coleta.

Para a coleta das amostras (item 3.1) foram utilizados frascos de vidro esterilizados e autoclavados. Flambou-se uma pinça com o auxílio de uma lamparina, e coletou-se as amostras que foram colocadas em frascos esterilizados. Das hortaliças foram utilizadas as folhas, exceto do brócolis em que foi utilizada a parte floral. Para os tubérculos, utilizou-se além da pinça, uma faca de serra também flambada para cortá-los em pedaços menores de modo que coubessem nos frascos. O solo foi coletado com o auxílio da faca e a água foi coletada diretamente no frasco. Após a coleta, as amostras foram levadas imediatamente para o laboratório para o processamento.

#### 3.4.1. Extração do pigmento piocianina para enriquecimento do meio Burtom (RINGEN, 1952)

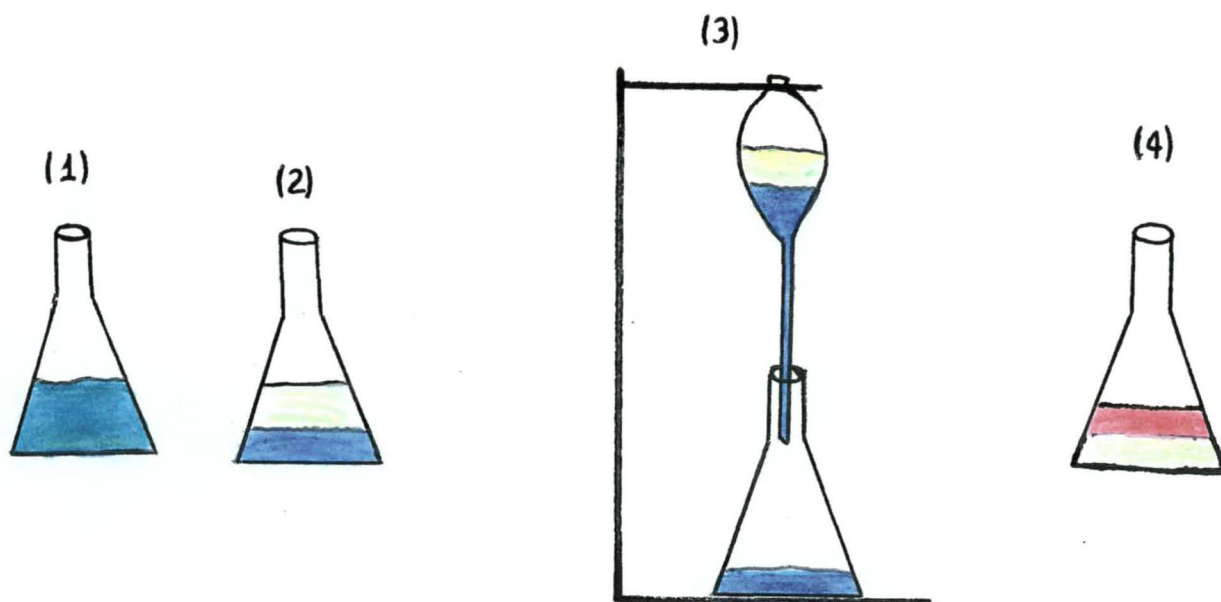
O enriquecimento do meio Burtom (item 3.3.1) foi obtido pela ação do pigmento azul esverdeado (devido à piocianina - azul e a fluoresceína - amarelo), o qual favorece

o desenvolvimento do gênero *Pseudomonas*. Para a extração do pigmento foi utilizada a seguinte metodologia.

Foram preparados 500 mL do meio de Burtom (item 3.3.1). A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada para extrair o pigmento foi cedida gentilmente pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEM). A cepa foi inoculada no meio de Burtom, e após 2 semanas em estufa à  $\pm 37^{\circ}\text{C}$ , o meio tornou-se intensamente esverdeado. Para que o pigmento fosse extraído com segurança, o meio foi autoclavado por 15 minutos à  $121^{\circ}\text{C}$  e 1 atm. Depois de resfriado, pode-se extrair o pigmento.

Ao meio líquido com pigmento, foi adicionado clorofórmio até que se observasse a formação de duas fases líquidas diferentes, sendo uma delas bem azulada. O meio foi colocado numa bureta, para decantar o clorofórmio (que formou a porção azulada – a piocianina) em um balão limpo. A essa porção de clorofórmio, foi acrescentado ácido clorídrico à 40% até que o líquido ficasse vermelho (a titulação com o ácido foi feita aos poucos). O pigmento extraído foi a piocianina, que em solução ácida é vermelha; a fluoresceína não é solúvel em clorofórmio. Não foi possível quantificar exatamente o volume de clorofórmio e de ácido clorídrico utilizados por não se saber a quantidade de pigmento que as bactérias haviam produzido. Como o pigmento extraído estava em solução ácida (vermelho) foi preciso colocar hidróxido de sódio a 40% para acertar o pH em 7,2 - 7,4. Dessa forma voltou a sua coloração azulada. Foi então preparado o meio de Burtom com 80% de água destilada e foram acrescentados 20% do pigmento extraído (itens 3.3.1. e 3.3.2.). Desse meio de Burtom enriquecido com o pigmento, 20 mL foram colocados em frascos Erlenmeyer de 50mL previamente esterilizados em autoclave por 15 minutos à  $121^{\circ}\text{C}$  e 1 atm.

FIGURA 2: Extração do Pigmento, utilizando o clorofórmio e o ácido clorídrico. (1) - frasco com meio de Burton e *P. aeruginosa*; (2) - adição de clorofórmio, formação de duas fases, a fase azulada contém o pigmento; (3) - decantação do clorofórmio com pigmento; (4) - adição de ácido clorídrico, para evidenciar a piocianina que em solução ácida é vermelha.



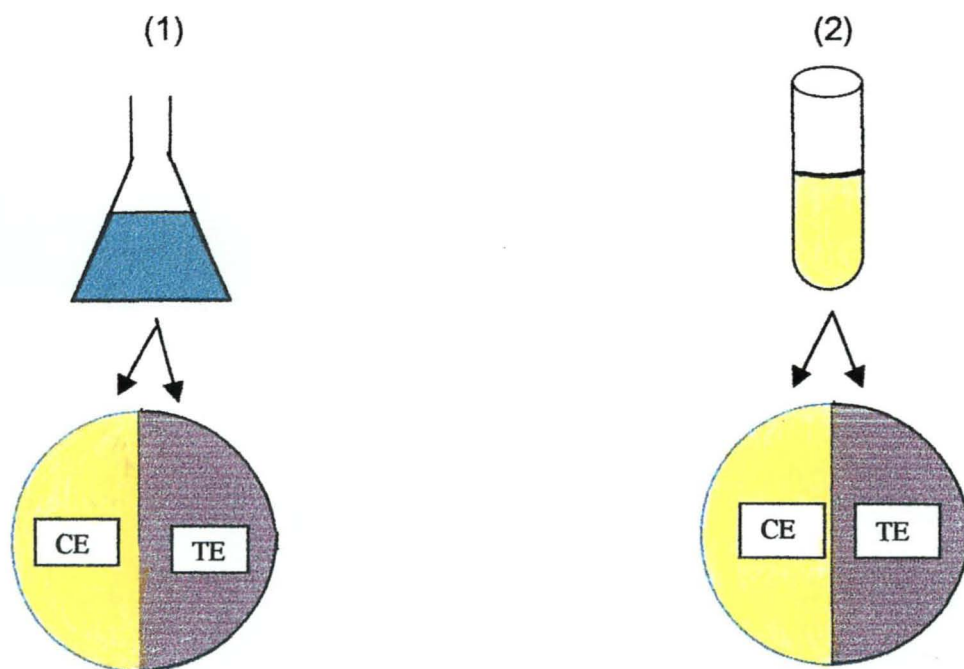
#### 3.4.2. Isolamento e Provas Bioquímicas.

As amostras coletadas foram transferidas assépticamente para tubos de ensaio 160x16 mm contendo 30 mL de caldo lactosado (item 3.3.9) e frascos Erlenmeyer

contendo 20 mL do meio de Burtom enriquecido (item 3.3.2). Em seguida as amostras foram colocadas em estufa à aproximadamente 37°C por um período de 24 – 48 horas.

Foram utilizadas placas de Petri com divisão, estéreis e descartáveis. Em uma metade foi colocado meio Teague (item 3.3.4) que é seletivo para bacilos Gram-negativos e na outra metade o meio Cetrimide (item 3.3.3) que é seletivo para *Pseudomonas*. Foram utilizadas duas placas para cada amostra. Para uma amostra, em uma das placas com os meios Teague e Cetrimide, foi semeado um inóculo do meio Burtom enriquecido (item 3.3.2) e na outra placa contendo os mesmos meios, um inóculo da mesma amostra no caldo lactosado (item 3.3.9).

FIGURA 3: Meio de Burtom enriquecido (1) e Caldo lactosado (2) ambos inoculados com amostra, semeados em placas contendo os meios Teague (TE) e Cetrimide (CE).



As placas foram incubadas em estufa à  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas e após esse período, foram escolhidas somente as placas onde houve formação de colônias bacterianas. De cada metade de uma placa foram escolhidas três colônias (de

preferência com a coloração levemente azulada) e cada colônia foi semeada em um tubo com ágar gelose (item 3.3.8) inclinado.

Cada tubo foi identificado com o nome do vegetal, de quais meios ele foi isolado e qual seu número (segundo a legenda: Alface BUTE 2 = alface vinda do meio Burtom, semeado no Teague, colônia 2). Esses tubos foram incubados em estufa a aproximadamente 37°C por 24 horas.

Das colônias presentes nos tubos de ágar gelose, foram feitas as provas bioquímicas descritas a seguir.

#### 3.4.2.1. Hugh-Leifson (HUGH,1953; KONEMAN et al, 2001)

As colônias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio Hugh-Leifson (O-F, item 3.3.6) para verificar o metabolismo oxidativo (referente à *Pseudomonas*) ou fermentativo. Foram feitos dois tubos contendo o meio Hugh-Leifson (item 3.3.6) com 5 mL cada um, por colônia, sendo que um dos tubos deve ser coberto com óleo mineral esterilizado. Os tubos foram incubados em estufa a  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Dessa forma deve ocorrer oxidação (formação de ácido) apenas no tubo sem o óleo mineral (em contato com o  $\text{O}_2$ ) uma vez que a *Pseudomonas aeruginosa* é um organismo estritamente aeróbio. Os tubos onde o metabolismo foi oxidativo, ficaram com as colorações amarela (tubo sem óleo mineral) e verde (tubo com o óleo mineral). Nos tubos onde ocorreu a fermentação a coloração de ambos (com e sem óleo) foi amarela.

#### 3.4.2.2. Motilidade (KONEMAN et al,2001)

O meio para testar a motilidade (item 3.3.7) é semi-sólido e em cada tubo foram colocados 5 mL. Os 4mm superiores do meio foram inoculados por picada. Os tubos foram colocados em estufa à  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Os tubos onde houve motilidade, apresentaram crescimento bacteriano de forma arborescente da região da picada (no centro) em direção à superfície do meio. Esse crescimento é característico de bactérias móveis que apresentam flagelo como é o caso da *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 3.4.2.3. Meio "P":

O meio P (item 3.3.5) serviu para evidenciar o pigmento produzido pelas bactérias do gênero *Pseudomonas*.

Foi feito o repique estriado na superfície do meio inclinado. Os tubos foram colocados em estufa à aproximadamente 37°C por 24 horas e deixados mais 24 horas em temperatura ambiente para intensificar a produção do pigmento.

#### 3.4.2.4. Prova da citocromo - oxidase pelo método de Kovacs (KOVACS, 1956).

A prova da Oxidase foi utilizada apenas para confirmar o metabolismo oxidativo das bactérias, verificado primeiramente através do Meio Hugh-Leifson. Foram utilizadas tiras para oxidase (impregnadas com  $\alpha$ -naftol e para-fenilenodiamina). As tiras foram colocadas, assépticamente, em uma placa de Petri esterilizada e receberam uma gota de água estéril (para facilitar a reação) e inóculos das colônias presentes no meio P (item 3.3.5). Após alguns minutos, onde havia bactérias não fermentadoras houve reação, e as tiras passaram da cor branca para um azul intenso, confirmando o metabolismo oxidativo dessas bactérias.

#### 3.4.2.5. Método da Coloração de Gram (BIER, 1994)

O método da Coloração de Gram serviu para identificar se as bactérias isoladas das amostras eram Gram-negativas ou Gram-positivas. As bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* são bacilos Gram – negativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**TABELA 1:** Vegetais, solo e água coletados na horta do Colégio Bom Jesus, e semeados nos meios Caldo Lactosado (CL), Burtom (BU), Teague (TE), Cetrimide (CE), Hugh-Leifson (O-F, oxidação-fermentação), “P”, e nas provas bioquímicas motilidade e oxidase.

Vegetais	Meio de Cultura	O-F	Motilidade	Meio P	Oxidase
Abobrinha	BU TE	+	+	+	+
	CL CE	+	+	+	+
Beterraba	CL CE	+	-	-	+
Couve	BUTE	-	-	-	
Repolho	CL TE	-	-	-	
Solo	CL TE	-	-	-	
Água	Não houve crescimento em placas				

**LEGENDA:** Metabolismo oxidativo: O–F e Oxidase +  
Bactéria móvel: Motilidade +  
Produção de pigmento: Meio “P” +

Nas amostras da coleta 1 (Tabela 1), a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada apenas da abobrinha. O metabolismo oxidativo da bactéria foi verificado através do meio Hugh-Leifson (O-F) e da oxidase como pode ser observado nas figuras 4 e 5.



FIGURA 4: Tubos de ensaio contendo o meio Hugh-Leifson (O-F, item 3.3.6) para verificar o metabolismo oxidativo ou fermentativo das colônias inoculadas. Dois tubos contendo o meio Hugh-Leifson foram utilizados, sendo que apenas um deles foi coberto com óleo mineral esterilizado para impedir a entrada de oxigênio. A oxidação (formação de ácido) ocorreu apenas no tubo sem o óleo mineral, uma vez que a *Pseudomonas aeruginosa* é um organismo estritamente aeróbio. Os tubos com bactérias de metabolismo oxidativo, ficaram com as colorações amarela (tubo sem óleo mineral) e verde (tubo com o óleo mineral).

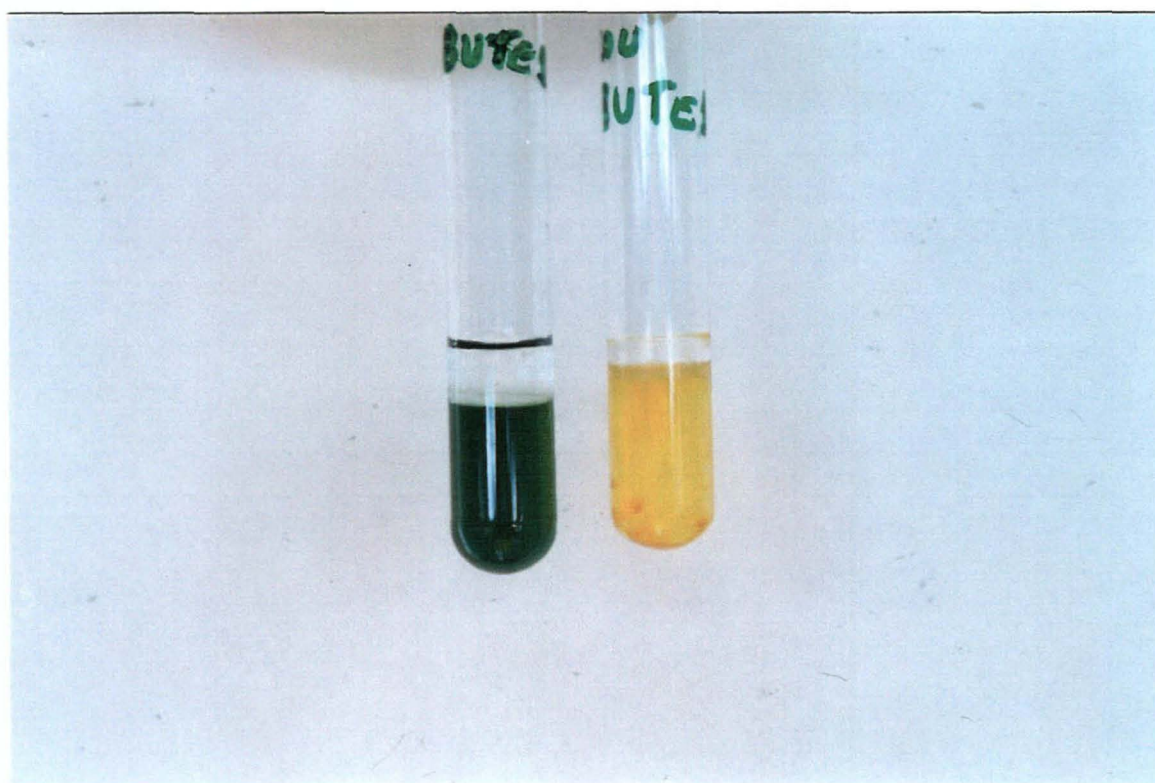
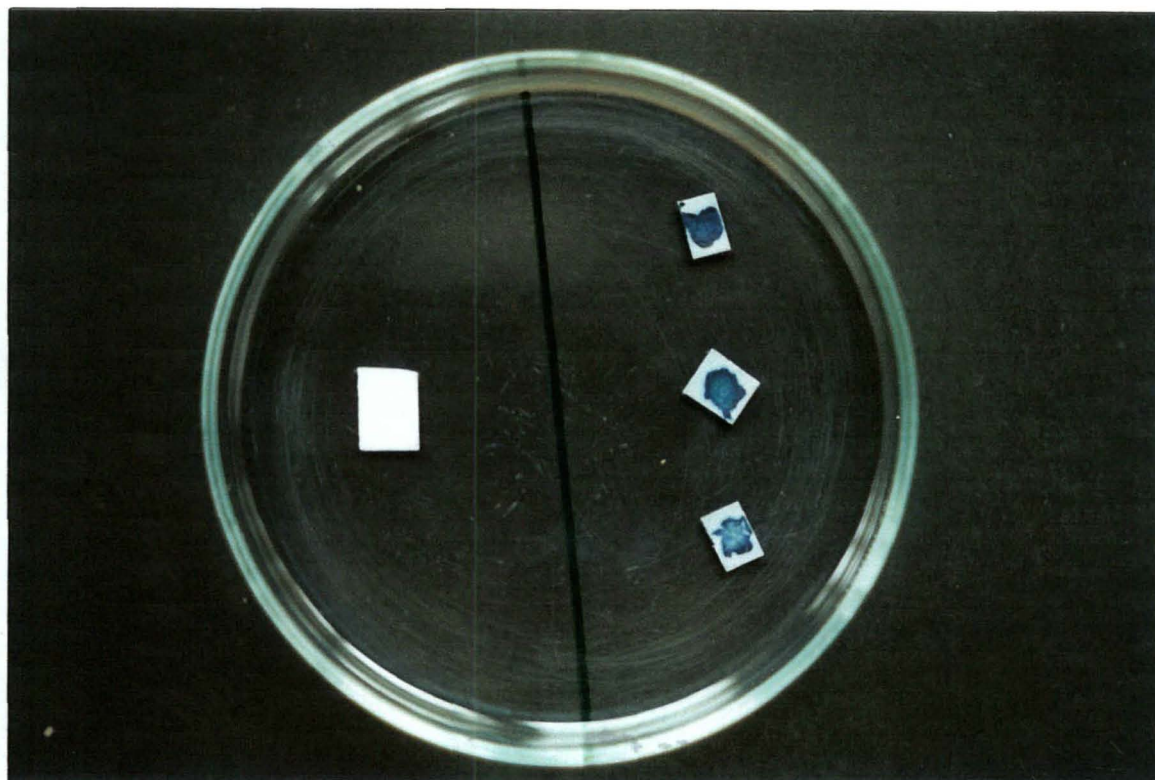


FIGURA 5: Tiras para oxidase utilizadas para confirmar o metabolismo oxidativo das bactérias. Onde haviam bactérias não fermentadoras ocorreu reação e as tiras passaram da cor branca para um azul intenso, confirmando o metabolismo oxidativo.



A caracterização da mobilidade foi verificada através do meio motilidade observado na figura 6, e a produção de pigmento foi verificada no meio P observado na figura 7.

FIGURA 6: Meio para testar a motilidade (item 3.3.7) inoculado por picada. Os tubos apresentam crescimento bacteriano em forma arborescente da região da picada (no centro) em direção à superfície do meio. Esse crescimento é característico de bactérias móveis que apresentam flagelo como é o caso da *Pseudomonas aeruginosa*.

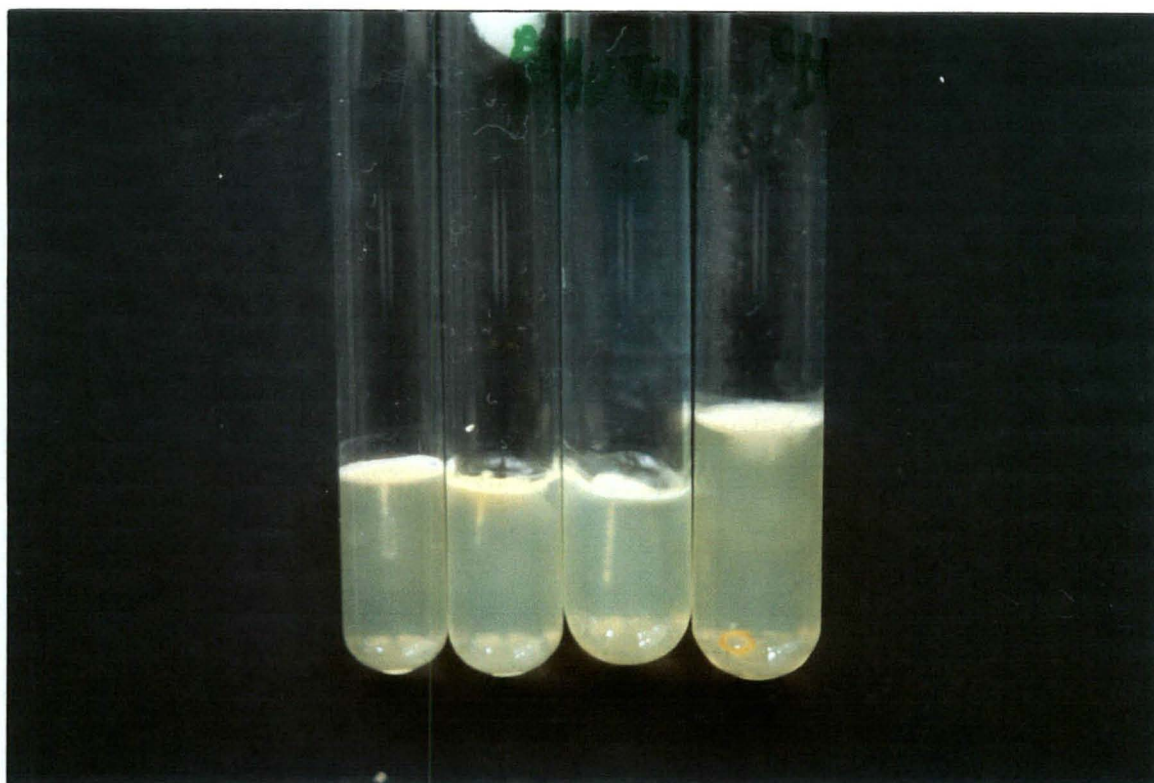
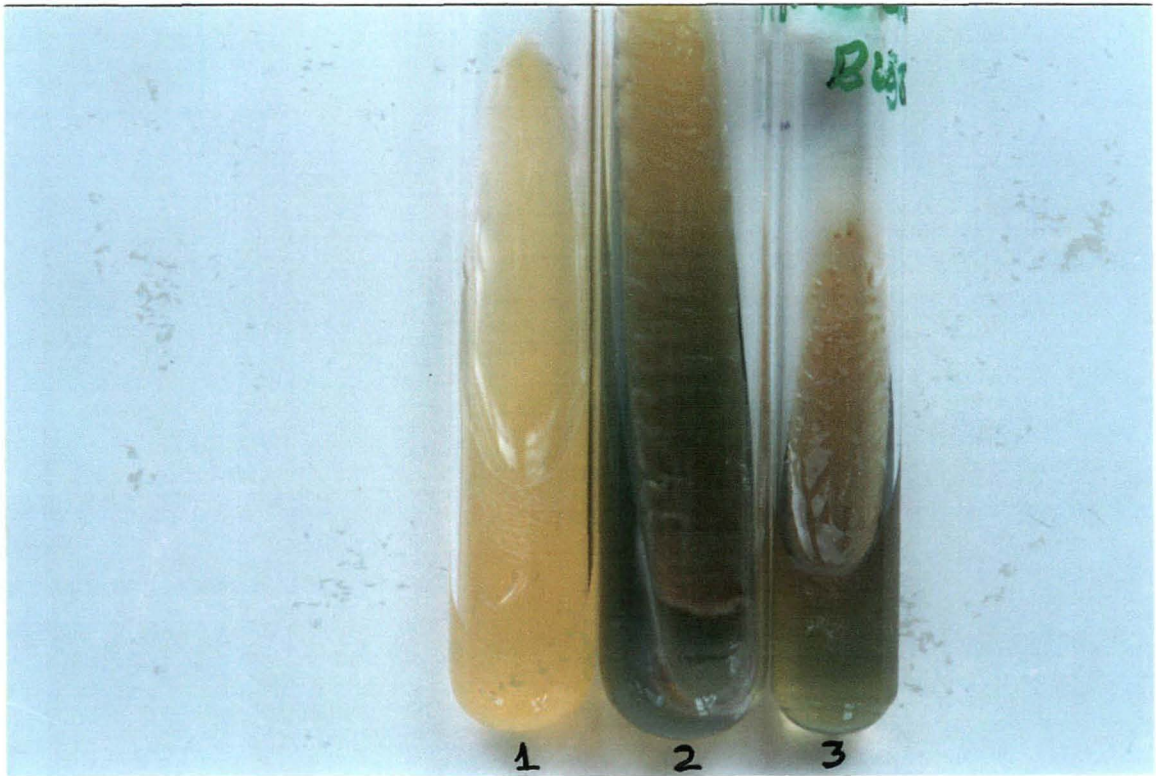




FIGURA 7: Meio P (item 3.3.5) utilizado para estimular a produção do pigmento produzido pelo gênero *Pseudomonas*. O tubo 1 representa o meio P não inoculado; os tubos 2 e 3 inoculados, mostram o pigmento produzido pela *P. aeruginosa*.



A contaminação da abobrinha cultivada nos meios Caldo Lactosado e Cetrimide (CL CE) e Burtom e Teague (BU TE), observado na figura 8, pode ter ocorrido devido ao seu contato com o solo, pois segundo GREEN et al., 1974, o solo pode ser considerado um reservatório natural para esta espécie.

FIGURA 8: Placa contendo os meios Teague (metade vermelha) e Cetrimide (metade branca) onde foram inoculados os meios de Burtom e Caldo Lactosado com amostras (fig.2), mostrando a formação de colônias em ambos.



As amostras de couve, repolho e solo tiveram resultados negativos. Na amostra de beterraba cultivada no meio Caldo Lactosado e Cetrimide (CL CE), observou-se o metabolismo oxidativo, mas não houve motilidade, isso pode ter ocorrido devido ao teste (itens 3.3.7. e 3.4.2.2.) ser de difícil interpretação pois as bactérias não fermentadoras tendem a crescer apenas na porção superior (principalmente aeróbia) do

meio, dificultando a visualização da motilidade. As bactérias do gênero *Pseudomonas* (bacilos Gram-negativos não fermentadores), raramente são imóveis, tendo como exemplo apenas a *P. mallei* e a *P. pseudomallei* que causam doença em cavalos. A amostra de água coletada não apresentou formação de colônias. A água utilizada para irrigação cultivada da rede de abastecimento da cidade de Curitiba, possivelmente não apresentou contaminação por ser água tratada.

Para obter um resultado mais fiel da fonte de contaminação deve-se recolher novas amostras de abobrinha e do solo dessa mesma horta e testá-las.

**TABELA 2:** Vegetais, solo e água coletados na horta da Rua Francisco Caron, e semeados nos meios Caldo lactosado (CL), Burtom (BU), Teague (TE), Cetrimide (CE), Hugh-Leifson (O-F, oxidação-fermentação), “P”, e nas provas bioquímicas Motilidade e Oxidase.

Vegetais	Meio de Cultura	O-F	Motilidade	Meio P	Oxidase
Alface	CL CE	+	-	-	+
Almeirão	CL CE	-	-	-	
Couve	CL TE	-	-	-	
Cenoura	CL TE	-	-	-	
Solo	CL CE	+	+	-	+
Água	Não houve crescimento em placas				

**LEGENDA:** Metabolismo oxidativo: O–F e Oxidase +  
Bactéria móvel: Motilidade +  
Produção de pigmento: Meio “P” +

Também, nas amostras provenientes da coleta 2 (Tabela 2) a bactéria isolada do solo cultivado no meio Caldo Lactosado e Cetrimide (CL CE) foi identificada como sendo do gênero *Pseudomonas*. Na amostra da alface cultivada no meio Caldo Lactosado e Cetrimide (CL CE), observou-se o metabolismo oxidativo, e novamente não houve motilidade, devido à dificuldade de interpretar o teste (itens 3.3.7. e 3.4.2.2.)



pois as bactérias não fermentadoras tendem a crescer apenas na porção superior (principalmente aeróbia) do meio, dificultando a visualização da motilidade. As amostras de almeirão, couve e cenoura tiveram resultados negativos. A amostra de água coletada não apresentou contaminação, pois não houve a formação de colônias. A água utilizada para irrigação também era proveniente da rede de abastecimento.

**TABELA 3:** Vegetais, solo e água coletados na horta da Rua Alberto Piekars, e semeados nos meios Caldo lactosado (CL), Burtom (BU), Teague (TE), Cetrimide (CE), Hugh-Leifson (O-F, oxidação-fermentação), “P”, e nas provas bioquímicas Motilidade e Oxidase.

Vegetal	Meio de Cultura	O-F	Motilidade	Meio P	Oxidase
Alface	CL TE	-	+	-	
	CL CE	+	-	-	+
Couve	CL TE	-	-	-	
Nabo	CL TE	-	+	+	
	CL CE	+	+	+	+
Solo	CL TE	-	-	-	
	CL CE	-	-	-	
Água	CL TE	-	-	-	

**LEGENDA:** Metabolismo oxidativo: O-F e Oxidase +  
Bactéria móvel: Motilidade +  
Produção de pigmento: Meio “P” +

Nos resultados das amostras da coleta 3 (Tabela 3) a bactéria isolada do nabo cultivado no meio caldo lactosado e cetrimide (CL CE) foi identificada como *Pseudomonas aeruginosa*. A contaminação também pode ter ocorrido devido ao contato do nabo com o solo, apesar da amostra de solo não ter apresentado contaminação por *P. aeruginosa*. Na amostra da alface cultivada no meio Caldo Lactosado e Cetrimide (CL CE), observou-se o metabolismo oxidativo, e não houve

motilidade, devido à dificuldade de interpretação do teste (itens 3.3.7. e 3.4.2.2.). As amostras de couve, solo e água apresentaram resultado negativo.

**TABELA 4:** Vegetais, solo e água coletados na horta da Colônia Avencal, e semeados nos meios Caldo lactosado (CL), Burtom (BU), Teague (TE), Cetrimide (CE), Hugh-Leifson (O-F, oxidação-fermentação), “P”, e nas provas bioquímicas Motilidade e Oxidase.

Vegetal	Meio de Cultura	O - F	Motilidade	Meio P	Oxidase
Alface	BU TE	-	+	-	
	CL TE	-	+	-	
Beterraba	BU TE	-	-	-	
	BU CE	-	+	-	
	CL TE	-	+	-	
	CL CE	+	+	-	+
Brócolis	BU TE	-	-	-	
	CL TE	-	-	-	
	CL CE	+	+	-	+
Couve	BU TE	-	-	-	
	CL TE	+	+	-	+
	CL CE	+	+	-	+
Solo	BU TE	-	+	-	
	CL TE	-	+	-	
Água	CL TE	-	-	-	

**LEGENDA:** Metabolismo oxidativo: O–F e Oxidase +  
Bactéria móvel: Motilidade +  
Produção de pigmento: Meio “P” +

Nos dados referentes às amostras da coleta 4 (Tabela 4), encontrou-se bactérias isoladas da beterraba cultivada no meio Caldo Lactosado e Cetrimide



(CL CE), do brócolis cultivado no meio Caldo Lactosado e Cetrimide (CL CE), e da couve cultivada no meio Caldo Lactosado e Cetrimide (CL CE) e Caldo Lactosado e Teague (CL TE) identificadas como sendo do gênero *Pseudomonas*. As demais amostras tiveram resultado negativo.

**TABELA 5:** Vegetais, solo e água coletados na horta do Colégio Nossa Senhora da Assunção, e semeados nos meios Caldo lactosado (CL), Burtom (BU), Teague (TE), Cetrimide (CE), Hugh-Leifson (O-F, oxidação-fermentação), “P”, e nas provas bioquímicas Motilidade e Oxidase.

Vegetal	Meio de Cultura	O - F	Motilidade	Meio P	Oxidase
Abobrinha	BU TE	-	+	-	
	CL TE	-	-	-	
Alface	BU CE	-	+	-	
	BU TE	-	+	-	
	CL TE	-	+	-	
Almeirão	BU TE	-	+	-	
	CL TE	-	+	-	
Beterraba	BU TE	-	-	-	
	CL TE	-	-	-	
Couve	BU TE	-	+	-	
Cenoura	BU TE	-	-	-	
	CL TE	-	+	-	
Solo	BU TE	-	+	-	
	BU CE	+	+	-	+
Água	Não houve crescimento em placas				

**LEGENDA:** Metabolismo oxidativo: O–F e Oxidase +  
Bactéria móvel: Motilidade +  
Produção de pigmento: Meio “P” +

E finalmente, nos dados da coleta 5 (Tabela 5), a bactéria isolada do solo cultivado no meio Burtom e Cetrimide (BU CE) foi identificada como sendo do gênero *Pseudomonas*. As demais amostras apresentaram resultado negativo. A amostra água utilizada para irrigação, apesar de ser água de poço armazenada em caixa d' água e não tratada, não apresentou crescimento bacteriano nas placas.

Das amostras: solo cultivado no meio Caldo Lactosado e Cetrimide (CL CE) (Tabela 2); beterraba cultivada no meio Caldo Lactosado e Cetrimide (CL CE), brócolis cultivado no meio Caldo Lactosado e Cetrimide (CL CE), couve cultivada nos meios Caldo Lactosado e Cetrimide (CL CE) e Caldo Lactosado e Teague (CL TE) (Tabela 4) e solo cultivado no meio Burtom e Cetrimide (BU CE) (Tabela 5), foram isoladas bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, devido aos resultados positivos obtidos em todas as provas bioquímicas (itens 3.4.2.1., 3.4.2.2., 3.4.2.3., 3.4.2.4. e 3.4.2.5.) às quais foram submetidas, entretanto como não houve a produção de piocianina, não se trata da espécie *aeruginosa*.

O objetivo desse trabalho consistiu em detectar a presença da espécie *Pseudomonas aeruginosa* em vegetais. A identificação da espécie *Pseudomonas aeruginosa* foi feita através da verificação do metabolismo oxidativo, da motilidade e da produção do pigmento piocianina. Foram escolhidas algumas hortas de pessoas conhecidas e de colégios. O ideal dessa pesquisa, era testar um número bem maior de hortas e se possível que todas elas tivessem as mesmas hortaliças e tubérculos. Porém, a única hortaliça encontrada em todas as hortas foi a couve. Atualmente não é comum as pessoas manterem uma horta em seus quintais; e quando o fazem, a variedade de vegetais é muito pequena. Também, o tempo destinado à realização dessa pesquisa foi curto, motivo pelo qual foram testadas apenas cinco (5) hortas.

Para uma pesquisa futura, seria interessante escolher hortas com grande variedade de vegetais, onde fossem coletadas várias amostras de cada vegetal e do solo em pontos diferentes dos canteiros, para verificar a maneira como a *P. aeruginosa* se distribui e sua incidência.

Alguns autores como KOMINOS et al., 1972, GREEN et al., 1974, WRIGHT, KOMINOS e YEE, 1976, REMINGTON e SCHIMPFF, 1981, CORREA, TIBANA e GONTIJO FILHO, 1990, desenvolveram estudos a partir de saladas e vegetais obtidos

diretamente da cozinha de hospitais. A contaminação dos vegetais por *P. aeruginosa* descrita em seus trabalhos foi muito significativa. Os fatores apontados como principais fontes de contaminação dos vegetais foram: solo, fertilizantes, água de irrigação, o cultivo, a colheita, os estágios de processamento e as diferentes fases de empacotamento, o armazenamento, o transporte, a distribuição e a manipulação para o seu preparo. As chicórias produzidas em sistemas hidropônicos (ARROYO et al., 1998) por serem consumidas cruas, podem ser a origem de infecções alimentares. Até o momento de sua industrialização, elas passam por diferentes fases como empacotamento, transporte e distribuição que contribuem com o aumento da carga microbiana. As temperaturas de armazenamento de alfaces hidropônicas acondicionadas em sacos plásticos também podem interferir na contaminação desse vegetal por microrganismos (FREIRE, 2000). Amostras de alface americana minimamente processadas analisadas aos 0, 3, 7 e 10 dias de armazenamento a 4°C, apresentaram elevada contaminação por *Pseudomonas aeruginosa* desde o primeiro dia de armazenamento até o 10º dia (COELHO et al., 2001). Desde o momento em que os vegetais são plantados até o momento de serem preparados para o consumo, a chance de ocorrer contaminação é muito grande, e é muito difícil determinar a fonte contaminante.

Ao comparar esses estudos com o presente trabalho, pode-se verificar que os vegetais somente poderiam ser contaminados pelo manuseio durante o plantio, pelo solo ou pela água de irrigação, uma vez que as amostras de vegetais foram coletadas em frascos esterilizados e encaminhadas diretamente para o laboratório. Isso veio reforçar a hipótese de que os vegetais (hortaliças e tubérculos) podem servir de reservatório para a espécie *Pseudomonas aeruginosa*.

Os trabalhos de SORIANO et al., 2000 e MENEZES et al., 2001 mostraram a importância da desinfecção como um dos métodos utilizados para higienizar vegetais. Soluções de hipoclorito de sódio ou permanganato de potássio podem ser usadas contra um largo número de organismos. A qualidade higiênica dos vegetais deve ser controlada para minimizar a população microbiana e o risco de doenças alimentares (SORIANO et al., 2000). O hipoclorito de sódio e sua forma diluída são bastante eficientes na desinfecção de águas para o consumo humano e para a lavagem de

frutas, verduras e hortaliças, sendo o seu uso recomendado pelo poder bactericida e baixo custo (MENEZES et al., 2001). Essa pode ser uma das maneiras eficazes de diminuir o risco de infecções alimentares, devido ao consumo de vegetais crus contaminados por bactérias.

Outra maneira eficaz de diminuir o risco de infecções alimentares, porém um tanto radical, é eliminar o consumo de vegetais crus e saladas da dieta de pacientes de alto risco (REMINGTON e SCHIMPFF, 1981).

Uma questão interessante sobre o uso do meio de Burtom deve ser abordada. O meio de cultura desenvolvido por Burtom et al., 1948 é utilizado para isolar a espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Esse meio modificado através da adição de piocianina é altamente seletivo, inibindo quase que completamente o crescimento de todos os outros microrganismos competitivos (RINGEN e DRAKE, 1952). Inicialmente, na coleta 1, verificou-se que nas placas contendo os meios Cetrimide e Teague (itens 3.3.3 e 3.3.4) inoculadas com amostras no meio de Burtom, raramente havia a formação de colônias. Nas coletas seguintes, foi utilizado (além do meio de Burtom) o Caldo Lactosado (item 3.3.9). As placas inoculadas com amostras no Caldo Lactosado, mostraram um número maior de colônias, o que facilitou o isolamento das bactérias. O Caldo Lactosado tem algumas vantagens em relação ao meio de Burtom, é nutritivo, seu preparo é bem mais fácil e rápido e seu custo é bem menor.

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi demonstrada a incidência de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de vegetais em duas das cinco hortas visitadas. As amostras abobrinha e nabo continham a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, mas também foi observada a presença de outras bactérias do gênero *Pseudomonas* nas amostras solo, beterraba, brócolis e couve.

Baseando-se em trabalhos anteriores e nesses resultados, é provável que os vegetais possam servir de reservatório para a espécie *Pseudomonas aeruginosa* e dessa forma sejam uma fonte de contaminação para pessoas debilitadas. Sugere-se que essa pesquisa seja retomada, de modo que mais hortas sejam visitadas, analisando-se um número maior de amostras para que seja comprovado o objetivo proposto nesse trabalho.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ARROYO, G.; GARCIA, O.; HEDÓ, L.; PRÉSTAMO, G. Microorganismos en endivias cultivadas en solucion reciclada mediante sistemas hidroponicos. **Revista Alimentária**, jun. 1998, p.45 – 50.
- BELTRAME, R. E.; SILVA FILHO, C. R. da.; TANAKA, I. I.; SORNAS, A. N. F. *Pseudomonas aeruginosa* - antibioticoterapia e perfil de resistência de cepas isoladas das UTIs dos hospitais da Faculdade de Medicina de Marília. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 56, n. 11, nov. 1999. Disponível em: <<http://www.cibersaude.com.br>> Acesso em: 19 jun. 2001.
- COELHO, A. F. S.; ORNELAS, E. A.; SILVA, C. C. da.; GLÓRIA, M. B. A. Pesquisa de *Pseudomonas* em Alface americana minimamente processada. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 21., 2001, Foz do Iguaçu - Paraná. **Caderno de Resumos**. p. 410.
- CORREA, C. M. C.; TIBANA, A.; GONTIJO FILHO, P. P. Avaliação de vegetais como fonte de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* para pacientes hospitalizados. 1.Nível de contaminação dos alimentos servidos aos pacientes. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 238-242, 1990.
- FREIRE, J.R. M.; ROBBS, C.F. Isolation and identification of patogenic bacteria in minimal processed hydriponic lettuce. **Revista Alimentaria**, p. 55 – 60, jan/fev 2000.
- GREEN, S. K.; SCHROTH, M. N.; CHO, J. J.; KOMINOS, S. D.; VITANZA-JACK, V. B. Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology**, v. 28, n. 6, p.987-991, dec.1974.

- HARDALO, C.; EDBERG, S. C. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 47 – 75, 1997.
- HUGH, R.; LEIFSON, E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. **Journal Bacteriology**, v. 66, p. 24-26, 1953.
- KOMINOS, S. D.; COPELAND, C. E.; GROSIK, B.; POSTIC, B. Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 567 – 570, Oct. 1972.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr. W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica, 2001. p. 263 – 319.
- KOVACS, N. Identification of *Pseudomonas pyocianea* by the Oxidase Reaction. **Nature**, 178, p. 703, 1956.
- MENEZES, A.M.D.; von LAER, A. E.; CUNHA, G. E. L. V. da.; RIBEIRO, G.A.; BOEMEKE JR., L. C. Avaliação da eficácia de diferentes métodos de lavagem de alface (*Lactuca sativa*) para o consumo. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 21., 2001, Foz do Iguaçu - Paraná. **Caderno de Resumos**. Foz do Iguaçu - Paraná. p. 372.
- OLIVEIRA, E. N. S.; BLASKOWSKI, M. M. M. e OLIVEIRA, E. B. Incidência de *Pseudomonas aeruginosa* em várias fontes naturais. I – Fezes de Indivíduos saudáveis. **Arquivo Biologia e Tecnologia**, v. 26, n. 3, p. 415- 418, 1983.
- PELCZAR, Jr. & MICHAEL, Joseph. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1996. Volume II, 2ª Edição, p. 147-148; 337.

- REMINGTON, J. S.; SCHIMPF, S. C. Please don't eat the salads. **The New England Journal of Medicine**, v. 304, n. 7, p. 433-434, Feb.12, 1981.
- RINGEN, L. M.; DRAKE, C. H. A study of the incidence of *Pseudomonas aeruginosa* from various natural sources. **Journal Bacteriology**, v. 64, p. 841-845, 1952.
- SORIANO, J. M.; RICO, H.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. **International Journal of Food Microbiology**, 58, p. 123-128, 2000.
- TRABULSI, L. R. *Pseudomonas*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3ª Edição. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 269-271.
- VISWANATHAN, P.; KAUR, R. Prevalence e growth of pathogens on salad vegetables, fruits e sprouts. **International Journal of Hygiene and Enviromental Health**, 203, p. 205-213, 2001.
- WRIGHT, C.; KOMINOS, S. D.; YEE, R. B. *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from Vegetable Salads. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 453-454, Março 1976.